

Les allergènes recombinants : le point de vue du clinicien

G. PAULI

RÉSUMÉ

Les techniques de génie génétique appliquées aux allergènes ont permis de produire des allergènes recombinants. Les principes et les différents stades de la production des allergènes recombinants sont rappelés. Le clonage des allergènes permet la caractérisation de l'ensemble des allergènes présents dans un extrait. Il permet en outre la séquence de l'ADN complémentaire, la détermination de la structure primaire de la protéine, et la mise en évidence d'éventuelles homologues de structure entre des allergènes différents. L'étude des épitopes T et B des allergènes est également possible. La validation des allergènes recombinants doit s'assurer de la pureté des allergènes recombinants, de leur absence de toxicité, de leur stabilité, mais surtout de leur activité immunologique et de leur identité avec l'allergène naturel, ce qui peut être réalisé par différentes techniques *in vivo* et *in vitro*. Des exemples sont donnés à propos des allergènes recombinants Bet v 1 et Bet v 2. Le futur des allergènes recombinants dans la recherche fondamentale et dans la pratique allergologique, à la fois sur le plan diagnostique et sur le plan de la désensibilisation, est envisagé.

SUMMARY

Recombinant allergens: the clinician's point of view. – Genetic engineering techniques applied to allergens have allowed the production of recombinant allergens. The principles and the various stages of recombinant allergen production are reviewed. The cloning of allergens allows characterization of all of the allergens present in an extract and also allows sequencing of the complementary DNA, determination of the primary structure of the protein, and demonstration of possible structural homologues between various allergens. The T and B epitopes of allergens can also be studied. The validation of recombinant allergens must ensure the purity of recombinant allergens, their absence of toxicity, their stability, but especially their immunological activity and their identity with the natural allergen, which can be performed by various *in vivo* and *in vitro* techniques. Examples are presented in relation to recombinant allergens Bet v 1 and Bet v 2. The future of recombinant allergens in basic research and allergological practice, both for diagnosis and for desensitization, is discussed.

Les moyens actuels de diagnostic en allergologie (tests cutanés, dosage d'IgE spécifiques) et la désensibilisation utilisent des extraits allergéniques « naturels », qui contiennent de nombreux autres composants que les molécules allergéniques ; dans certains extraits commerciaux, des allergènes majeurs importants peuvent être

absents. En effet, le contenu en molécules allergéniques d'un extrait dépend :

– De la source de production du matériel allergénique : pour les pollens ce contenu allergénique peut dépendre des conditions environnementales, pour les moisissures il peut dépendre du stade de maturation de la culture qui a servi à produire

Service de Pneumologie, Hôpital Civil, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, B.P. 426, 67091 STRASBOURG Cedex.

Reçu le 21 février 1996.

PAULI G. – Les allergènes recombinants : le point de vue du clinicien. *Rev. fr. Allergol.*, 1996, 36 (5), 455-458.

l'allergène, pour les allergènes animaux les allergènes peuvent être différents selon que l'allergène a été préparé à partir de différentes espèces animales ou à partir de différents constituants de l'animal (pelage, peau, urine). Pour la pomme, il a été montré récemment que l'activité allergénique de l'extrait peut dépendre des espèces de pommes utilisées et de la maturation de la pomme elle-même.

– Le contenu allergénique des extraits dépend encore des procédés d'extraction et de stockage utilisés. La purification de l'extrait allergénique entraîne également la copurification d'enzymes qui peuvent dégrader les molécules allergéniques. Le chauffage peut aussi dénaturer des allergènes thermolabiles.

Depuis 1988, les techniques de génie génétique ont été appliquées aux allergènes. Les ADN de nombreux allergènes ont été clonés et introduits dans des vecteurs d'expression, ce qui a permis la production des allergènes recombinants correspondants [1].

PRINCIPE DE LA PRODUCTION DES ALLERGÈNES RECOMBINANTS

A partir des ARN messagers obtenus à partir d'un agent allergénique, on produit les séquences d'ADN complémentaires (ADNc) correspondantes. Les ADNc sont ensuite insérés dans des phages, et les clones de bactéries infectées par ces phages qui produisent des allergènes, sont sélectionnés. Cette sélection des clones bactériens peut se faire d'après leur fixation d'anticorps IgE humains ou d'immunoglobulines monospécifiques d'animaux sensibilisés ou encore d'anticorps monoclonaux murins. Puis on isolera l'ADNc spécifique d'un allergène, on l'insérera dans un plasmide et on le fera produire par une culture de bactéries hôtes. Les allergènes recombinants peuvent également être produits à partir de levures.

INTÉRÊT DU CLONAGE DES ALLERGÈNES

Le clonage des allergènes permet la *caractérisation de l'ensemble des allergènes présents dans un extrait* ; ceci peut être utile pour la recherche d'allergènes fragiles, ou non hydrosolubles, qui peuvent ne pas être isolés par les procédés de purification habituels des protéines [2].

Le clonage des allergènes permet la *séquence de l'ADN complémentaire*. Ceci permettra la détermination de la structure primaire de la protéine allergénique, ainsi que des comparaisons avec des

banques de données d'ADN, pouvant conduire à la mise en évidence d'identités et d'homologies. A titre d'exemple, il existe plus de 80 p. cent d'homologies entre Bet v 1 (allergène majeur du bouleau), Aln g 1 (allergène majeur de l'aulne), Cor a 1 (allergène majeur du noisetier) et Car b 1 (allergène majeur du charme). De même, on a pu montrer que la protéine recombinante de Bet v 1 avait une homologie avec des protéines de résistance aux maladies que l'on retrouve dans de nombreux autres végétaux (haricot, persil, petit pois, etc.). On pourra également détecter des homologies avec des molécules isomorphes (variants moléculaires qui peuvent ne différer que de quelques acides aminés, et qui ont le même poids moléculaire, la même structure tridimensionnelle et les mêmes fonctions biologiques).

Le clonage des allergènes permet l'étude des *épitopes des allergènes*.

– *L'étude des épitopes T* : il s'agit d'épitopes qui ont une structure dépendant de la structure primaire de la molécule allergénique et sont formés en général par des séquences de 10 à 12 acides aminés. Cette étude des épitopes T est possible grâce à l'utilisation de peptides chevauchants (synthétisés in vitro ou obtenus par hydrolyse enzymatique). L'étude de la stimulation in vitro par ces peptides de clones de cellules T spécifiques de l'allergène permet d'identifier les épitopes T (étude réalisée pour Bet v 1 par Ebner [3], pour Der p 1 par Yssel [4], pour Fel d 1 par Rogers [5]). D'après ces études il s'avère que les épitopes T sont multiples mais que certains peuvent être immunodominants.

– *L'étude des épitopes B* est également possible. Ces épitopes ont une structure tridimensionnelle et sont conformationnels. La détermination des épitopes B peut se faire par des anticorps monoclonaux murins, ces épitopes déterminés chez l'animal seront ensuite comparés avec les épitopes reconnus par des IgE humaines. Les résultats obtenus seront comparés à ceux qui résultent de l'utilisation de molécules allergéniques natives.

VALIDATION DES ALLERGÈNES RECOMBINANTS [6]

Cette validation doit répondre aux étapes suivantes :

Il faudra s'assurer de la pureté des allergènes recombinants, de leur absence de toxicité, de leur stabilité.

Il faudra surtout établir leur activité immunologique et leur identité avec l'allergène naturel en utilisant des techniques *in vitro* et *in vivo*.

En effet, les allergènes produits dans les systèmes bactériens ne peuvent pas être glycosylés, alors que les allergènes naturels sont souvent des glycoprotéines. Un allergène recombinant peut par ailleurs n'être qu'un des isomorphes de l'allergène naturel.

– *Les méthodes in vitro* ont pour but de démontrer la capacité de fixation des anticorps IgE spécifiques sur les allergènes recombinants. Différentes techniques sont utilisées : ELISA, RAST, CAP, immunoblotting, inhibition de l'ELISA ou du RAST, l'allergène naturel étant fixé sur la phase solide. On déterminera également la capacité de libération d'histamine des allergènes recombinants au niveau de basophiles de sujets sensibilisés.

Nous avons pu ainsi montrer sur 50 sérums de patients sensibilisés au pollen de bouleau, que ces sérums fixaient à la fois l'allergène naturel du bouleau et les allergènes recombinants Bet v 1 et Bet v 2 [7]. Les allergènes recombinants étaient également reconnus par ces sérums en utilisant la technique de l'immunoempreinte. Larsen [8] a montré que l'allergène recombinant Bet v 1 était capable d'inhiber le RAST bouleau, l'allergène naturel bouleau étant fixé sur la phase solide. La capacité de provoquer une libération d'histamine sur des basophiles de sujets sensibilisés a été également démontrée pour l'allergène recombinant Bet v 1 et Bet v 2 par Valenta [9] et par G. Pauli et coll. [7].

La capacité de fixation des anticorps anti-pollens de graminées sur les allergènes recombinants de la phléole a été également démontrée chez 180 patients atteints de pollinose aux graminées [10]. Cette étude a montré en outre que l'allergie aux pollens de graminées était détectée avec un mélange de 4 allergènes recombinants chez 94 p. cent des patients sensibilisés à la phléole.

– *Les méthodes in vivo* comportent l'étude de modèles expérimentaux chez l'animal (des immunisations avec l'allergène recombinant du bouleau ont été réalisées chez le primate ainsi que chez la souris), et l'étude de tests cutanés chez les sujets allergiques sensibilisés.

Mesure de l'activité in vivo des allergènes recombinants

Différentes méthodes ont été utilisées : comparaison du seuil de réactivité cutanée vis-à-vis de l'allergène naturel et vis-à-vis de l'allergène recombinant, étude quantitative de la réaction cutanée en utilisant des dilutions séquentielles et en tra-

çant une courbe dose-réponse. Pour ces études, des pricks-tests ou des intradermo-réactions ont été réalisés. A l'heure actuelle, quatre études ont fait l'objet de publications [7, 11, 12, 13].

Seuls deux tiers des sujets allergiques à Der p 2 sont détectés par l'utilisation en tests cutanés de l'allergène recombinant [11]. Pour r Asp f 1 [12], parmi 15 patients présentant une aspergillose bronchopulmonaire allergique, 10 sont détectés par tests cutanés et par recherche d'IgE spécifiques vis-à-vis de l'allergène recombinant [12]. Pour la phospholipase A2, 6 patients sur 6 réagissent à la phospholipase A2 naturelle et au recombinant phospholipase A2, mais les pentes des courbes dose-réponse sont différentes, indiquant qu'il n'y a pas identité absolue de l'activité allergénique dans les deux préparations [13].

Pour les recombinants Bet v 1 et Bet v 2, 50 patients sur 50 allergiques au bouleau, réagissent à au moins un allergène recombinant : 47 au recombinant Bet v 1 (27 à 3 µg/ml et 20 à 10 µg/ml), 10 réagissent au recombinant Bet v 2 (3 à 3 µg/ml et 7 à 10 µg/ml), et 7 réagissent vis-à-vis des deux allergènes recombinants. Aucune réaction positive n'a été observée chez les contrôles. On peut donc dire que la sensibilité des recombinants majeurs rBet v 1 et rBet v 2 est de 100 p. cent pour le diagnostic de l'allergie au bouleau. Dans cette étude, les tests cutanés effectués avec l'allergène recombinant étaient plus sensibles que les tests in vitro (ELISA et immunoblots) [7]. La confrontation de l'histoire clinique avec les réactivités cutanées au recombinant bouleau nous a permis de montrer :

– Que les polliniques monosensibilisés au bouleau étaient toujours positifs au recombinant Bet v 1 et ne réagissaient jamais au recombinant Bet v 2 ;

– Que les polliniques sensibilisés au bouleau et ayant une sensibilisation aux graminées et/ou aux herbacées avaient une réaction positive vis-à-vis du recombinant Bet v 1 et occasionnellement vis-à-vis du recombinant Bet v 2 ;

– Que les patients monosensibilisés au recombinant Bet v 2 n'avaient pas de signes cliniques pendant la saison des bétulacées (bien qu'ils aient un test cutané positif au bouleau), mais avaient une pollinose clinique aux graminées ou aux herbacées ;

– Que le seuil de réactivité cutanée était plus bas chez les patients allergiques au bouleau avec une pollinose clinique ;

– Que les patients qui avaient une allergie alimentaire associée (rosacées, noisettes, ombellifères) étaient toujours positifs au recombinant Bet v 1.

FUTUR DES ALLERGÈNES RECOMBINANTS

Dans la recherche fondamentale

– Ils sont des outils irremplaçables pour l'étude des épitopes T et B grâce à des polypeptides recombinants obtenus par coupure de l'ADN complémentaire d'un allergène et reclonage des fragments.

– Ils permettent l'étude de facteurs bloquants de la réaction antigènes-anticorps et/ou de la dégranulation des basophiles et des mastocytes. L'utilisation de molécules recombinantes Fab bloquantes, de peptides bloquants, d'haptènes immunodominants recombinants peut être envisagée [14].

– En expérimentation animale, leur utilisation permet de s'orienter vers de nouvelles stratégies thérapeutiques (switch vers les Th1), par l'administration de salmonelles non pathogènes exprimant la séquence codante de l'allergène ; ces expériences d'immunisation ont été faites par voie orale [1].

Dans la pratique allergologique [14, 15, 16]

– Ils permettent une amélioration des extraits en éliminant les extraits instables (par exemple le recombinant Mal d 1 de la pomme pourrait remplacer les extraits naturels actuels).

Certains procédés peuvent également permettre d'éliminer la toxicité de certaines protéines allergéniques.

– Ils devraient améliorer la standardisation des extraits allergéniques : en permettant l'obtention d'extraits à activité stable ayant la même composition en allergènes majeurs et reproductibles de lot à lot.

– Ils devraient permettre de s'orienter vers des désensibilisations plus ciblées, basées sur l'allergogramme, voire sur la quantité d'IgE spécifiques vis à vis des différentes molécules allergéniques.

– Enfin, les applications de la recherche fondamentale devraient s'étendre aux traitements futurs de désensibilisation : suppression des épitopes B, utilisation d'épitopes T, thérapie passive pour saturer les mastocytes, injection d'anticorps compétitifs pour les IgE.

CONCLUSION

La production d'allergènes recombinants représente une avancée qui a déjà permis des progrès importants dans l'étude de la structure des allergènes et dans la connaissance de leur carte épitopique. D'ores et déjà elle doit permettre d'améliorer les possibilités diagnostiques et thérapeutiques, notamment la désensibilisation, grâce à des standards de référence parfaitement définis. Dans le futur, elle devrait déboucher sur de nouvelles formes de désensibilisation.

RÉFÉRENCES

1. Scheiner O., Kraft D. – Basic and practical aspects of recombinant allergens. *Allergy*, 1995, 50, 385-391.
2. Peltre G. – Les allergènes recombinants des pollens de graminées. *Rev. fr. Allergol.*, 1995, 35, 283-285.
3. Ebner C., Szepefalusi Z., Ferreira F. et coll. – Identification of multiple T. cell epitopes on Bet v I, the major birch pollen allergen, using specific T cells. *J. Immunol.*, 1993, 150, 1047-1054.
4. Yssel H., Johnson K.E., Schneider P.V. et coll. – T. cell activation-inducing epitopes of the house dust mite allergen Der p I. Proliferation and lymphokine production patterns by Der p I-CD4+ T cell clones. *J. Immunol.*, 1992, 148, 738-745.
5. Rogers B.L., Craig B.J., Nault A.K. et coll. – Potential therapeutic recombinant proteins comprised of peptides containing recombinant T cell epitopes. *Mol. Immunol.*, 1994, 31, 955-966.
6. Bousquet J., Valenta R. – *In vivo* and *in vitro* use of recombinant allergens. *ACI News*, 1994, 6, 54-59.
7. Pauli G., Oster J.P., Deviller P. et coll. – Skin testing with recombinant allergens r Bet v 1 and birch profilin, r Bet v 2: diagnostic value for birch pollen and associated allergies. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1996, 97, 1 100-9.
8. Larsen J.N. – Isoallergens significance in allergen exposure and response. *ACI News*, 1995, 5, 141-146.
9. Valenta R., Sperr W.R., Ferreira F. et coll. – Induction of specific histamine release from basophils with purified natural and recombinant birch pollen allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1993, 91, 88-97.
10. Laffer S., Spitzauer S., Susani M., Pairleithner H., Schweiger C., Gronlund H., Menz G., Pauli G., Ishii T., Noltze H., Ebner C., Schon A., Kraft D., Eichler H., Valenta R. – Evaluation of purified recombinant timothy grass (phleum pratense) pollen allergens for *in vitro* diagnosis of grass pollen allergy: a population study. *Soumis à J. Allergy Clin. Immunol.*
11. Lynch N.R., Thomas W., Chua Y. et coll. – *In vivo* biological activity of recombinant Der p II allergen of house dust mite. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1994, 105, 70-74.
12. Moser M., Cramer R., Brust E., Suter M., Menz G. – Diagnostic value of recombinant *Aspergillus fumigatus* allergen I/a for skin testing and serology. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1994, 92, 1-11.
13. Muller U.R., Dudler T., Schneider T. et coll. – Type I skin reactivity to native and recombinant phospholipase A2 from honeybee venom is similar. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1995, 96, 395-402.
14. Valenta R., Vrtala S., Ball T. et coll. – Allergen-specific therapy in Type I allergy: new concepts based on recombinant allergens. *ACI News*, 1994, 6, 165-169.
15. Mohapatra S.S. – Recombinant allergens and allergen standardization. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1991, 87, 621-625.
16. Mohapatra S.S. – Therapeutic potential of recombinant allergens. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 1992, 99, 265-270.